

Федеральное государственное автономное
Образовательное учреждение
Высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

« ____ » _____ 20 ____ г.

МАГИСТРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Уменьшение токсичности вальпроевой кислоты
за счет ее адресной доставки в головной мозг ДНК – аптамерами

06.04.01. «Биология»
06.04.03.01 «Биофизика»

Научный руководитель профессор, д.б.н.

Т.Н. Замай

Выпускник ББ16–03М 041625613

В.О. Ющенко

Рецензент профессор, д.б.н.

А.А. Савченко

Красноярск 2018

РЕФЕРАТ

Магистерская работа по теме «Уменьшение токсичности вальпроевой кислоты за счет ее адресной доставки в головной мозг ДНК–аптамерами» содержит 56 страниц текстового документа, 11 иллюстраций, 63 использованных источников.

ДНК – АПТАМЕРЫ, ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР, ВАЛЬПРОЕВАЯ КИСЛОТА, ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Объект исследования – ДНК– олигонуклеотиды (аптамеры), способные проникать через гематоэнцефалический барьер мозга мыши, белок стрептавидин, вальпроевая кислота.

Цель данной работы: Снизить токсичность вальпроевой кислоты за счет ее адресной доставки в головной мозг ДНК–аптамерами

Исходя из цели, были поставлены следующие задачи:

1. Разработать систему адресной доставки вальпроевой кислоты на основе белка стрептавицина и ДНК–аптамеров, в качестве вектора для переноса комплекса через гематоэнцефалический барьер.
2. Разработать метод оценки эффективности адресной доставки комплекса ДНК– аптамеров с ВК в головной мозг мыши.
3. Сравнить содержание ВК в различных тканях у мышей после введения чистой ВК и в комплексе с аптамерами.

В результате проведенного исследования было показано, что комплекс вальпроевой кислоты с белком стрептавидином и ДНК – аптамерами, могут быть использованы для адресной доставки вальпроевой кислоты в головной мозг. При этом, использование биотинилированного аптамера позволит повысить эффективность комплекса. Разработан метод оценки эффективности адресной доставки комплекса ДНК – аптамеров с вальпроевой кислотой в головной мозг мыши. Показано, что аптамеры проносят ВК в комплексе с белком стрептавидином через ГЭБ в головной мозг мыши. Создание комплекса ускоряет процесс выведение вальпроевой кислоты из организма и снижает концентрацию гепатотоксичных метаболитов в печени.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. Основная часть.....	8
1.1 Аптамеры.....	8
1.1.2 Аптамеры в качестве терапевтических агентов.....	10
1.2 Хронические неврологические болезни.....	11
1.2.1 Эпилепсия.....	12
1.2.2 Эпилептогенез.....	13
1.2.3 Механизм эпилептогенеза.....	14
1.3 Противосудорожные лекарственные препараты.....	15
1.3.1 Вальпроевая кислота.....	16
1.4 Гематоэнцефалический барьер.....	18
1.4.1 Эндотелиоциты.....	20
1.4.2 Перициты.....	20
1.4.3 Астроциты.....	21
1.4.4 Нейроны.....	22
1.4.5 ABC– белки–транспортёры.....	22
1.5 Транспорт веществ через гематоэнцефалический барьер.....	24
1.6 Проблемы доставки лекарственных препаратов в мозг через гематоэнцефалический барьер.....	25
2. Материалы и методы.....	27
2.1 Объекты исследования.....	27
2.2 Методика связывания аптамер со стрептавидином.....	27
2.3 Методика отчистки органов животных от крови транскардиальной перфузией.....	28
2.4 Методика изготовления гистологических криосрезов для оценки прохождения белка через ГЭБ мыши.....	29
2.5 Методика электрофореза на агарозном геле.....	30

2.6 ПЦР– амплификация аптамер.....	30
2.7 Методика приготовления стандартов из гомогенатов органов для построения калибровочной кривой хроматографа.....	31
2.8 Оценка связывания вальпроевой кислоты с белком стрептавидином методом фильтрации.....	32
2.9 Методика связывания пула аптамер со стрептавидином и вальпроевой кислотой.....	32
3. Результаты и их обсуждение.	35
3.1 Получение комплексов вальпроевой кислоты с аптамерами.	35
3.2 Оценка эффективного связывания вальпроевой кислоты со стрептавидином.....	38
3.3 Оценка эффективности переноса аптамерами белка стрептавидина через гематоэнцефалический барьер.....	40
3.4 Исследования транспорта вальпроевой кислоты в головной мозг.....	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	47
ВЫВОДЫ.....	48
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	49
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	50

ВВЕДЕНИЕ

Главным барьером на пути прохождения веществ в головной мозг является гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). ГЭБ представляет собой высокодинамичный биологический мембранный комплекс, который регулирует гомеостаз мозга и перенос молекул из крови для удовлетворения потребностей в питательных веществах и энергии. Одновременно с этим, ГЭБ ограничивает проникновение патогенов, токсичных химических веществ и продуктов обмена, поддерживая его целостность. Такой динамический характер ГЭБ является серьезной проблемой для транспортных систем доставки лекарственных препаратов в ткань нейронов при лечении большинства заболеваний и расстройств, поражающих мозг [1].

Примерно 98% малых молекул и почти все крупные молекулы со средней молекулярной массой более 1 кДа, такие как рекомбинантные белки или гидрофобные лекарственные препараты, полностью не могут пересечь гематоэнцефалический барьер. Разработка безопасных и неинвазивных методов доставки лекарственных веществ в мозг представляет собой серьезную проблему и актуальную задачу, для решения которой нужны новые стратегии [2].

В настоящее время больше внимания уделяется доставке молекул лекарственного средства через взаимодействие с конкретными переносчиками или рецепторами, экспрессируемыми на просветной стороне эндотелиальных клеток.

Таковыми переносчиками могут выступать моноклональные антитела, специфичные к рецепторам ГЭБ или наночастицы. Однако, и те, и другие имеют ряд ограничений в использовании – большой размер и иммуногенность антител, и потенциальная токсичность наночастиц [3].

Аптамеры, короткие олигонуклеотидные РНК или ДНК, способные с высокой аффинностью и специфичностью связываться с молекулой –

мишенью являются привлекательными аналогами моноклональных антител. Не уступая последним в специфичности к мишени, аптамеры обладают преимуществами по сравнению с белковыми антителами – они неиммуногенны, нетоксичны, термостабильны, получение с помощью химического синтеза делает их использование экономически выгоднее [4].

Такие достоинства аптамер по сравнению с антителами позволяют заменить последние и использовать аптамеры, специфичные к рецепторам гематоэнцефалического барьера в качестве транспортного вектора, для целенаправленной доставки потенциальных лекарственных препаратов в головной мозг [5].

Терапия заболеваний центральной нервной системы, а в частности эпилепсии, заключается в применении ряда лекарственных препаратов, которые помимо воздействия на очаг воспаления оказывают огромное сопутствующее негативное влияние. Зачастую, применение данной группы таких препаратов вызывает токсические действия на органы и ткани выделительной системы.

В связи с этим нами была поставлена следующая цель – снизить токсичность вальпроевой кислоты за счет ее адресной доставки в головной мозг ДНК–аптамерами.

Исходя из цели, были поставлены следующие задачи:

1. Разработать систему адресной доставки вальпроевой кислоты на основе белка стрептавидина и ДНК–аптамеров, в качестве вектора для переноса комплекса через гематоэнцефалический барьер.
2. Разработать метод оценки эффективности адресной доставки комплекса ДНК– аптамеров с ВК в головной мозг мыши.
3. Сравнить содержание ВК в различных тканях у мышей после введения чистой ВК и в комплексе с аптамерами.

Работа выполнена в «Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий» в Красноярском государственном медицинском университете имени профессора В.Ф. Войно– Ясенецкого Минздрава России.

1 Основная часть

1.1 Аптамеры

За последние десятилетия хранилище генетической информации в живых организмах (ДНК) и кодирование генов (РНК) изучаются не только в качестве естественных носителей информации. Функциональные свойства нуклеиновых кислот заметно расширились, олигонуклеотиды стали использовать для создания терапевтических агентов и биокатализаторов [6].

Аптамеры представляют собой класс синтетических агентов на основе олигонуклеотидов РНК и ДНК, которые действуют как аффинные зонды или элементы молекулярного распознавания в диагностике и терапии. Термин аптамер, полученный из латинского слова «*aptus*», который означает «соответствие», был впервые представлен лауреатами Нобелевской премии Шостаком и Эллингтоном, когда они описали селекцию молекул РНК *in vitro*, которые специфически связываются с различными органическими красителями [7].

По химическому составу аптамеры являются короткими олигонуклеотидами ДНК / РНК длиной до 80 нуклеотидов, способные с высоким сродством и специфичностью связываться с молекулами–мишенями [8]. В настоящее время получены аптамеры к различным мишеням начиная от простых молекул и заканчивая целыми клетками и даже тканями.

Из – за своих уникальных свойств аптамеры функционально сопоставимы с традиционными антителами, но обладают несколькими преимуществами, включая их относительно небольшие физические размеры, гибкую структуру, быстрое химическое производство, универсальную химическую модификацию, высокую стабильность и отсутствие иммуногенности. Кроме того, многие аптамеры интернализуются при

связывании с клеточными рецепторами, что делает их полезными целевыми агентами доставки лекарственных препаратов [9].

Поиск специфичных последовательностей олигонуклеотидов получил название систематической эволюцией лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX). Данный метод отбора включает в себя основные повторяющиеся этапы: 1) библиотека олигонуклеотидов инкубируется с молекулой–мишенью; 2) комплексы олигонуклеотидов с мишенью отделяются от несвязавшихся олигонуклеотидов; 3) производится амплификация связавшихся последовательностей. На рисунке 1 представлен принцип метода.

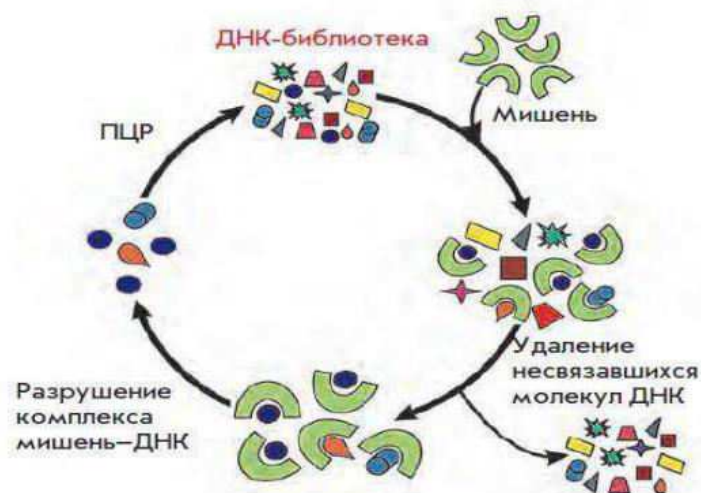


Рисунок 1 – Общая схема селекции аптамеров.

В результате данного отбора, выбираются наиболее специфичные олигонуклеотидные последовательности, обладающие высоким сродством к молекуле–мишени.

Связывающая способность аптамера с лигандом описывается ее константой диссоциации (K_d), которая, в свою очередь, определяется отношением констант диссоциации и скорости ассоциации [10]. Наилучшее

связывание аптамера с молекулой–мишенью определяется K_d в наномолярном и пикомолярном диапазоне.

1.1.2 Аптамеры в качестве терапевтических агентов

Одной из ведущих тенденций в современной медицине является создание систем направленного транспорта. Предпосылкой к её появлению явилось то, что препарат, введенный в организм традиционными способами, распределяется в нем относительно равномерно, проникая не только в органы–мишени, где он должен проявить терапевтический эффект, но и в другие органы, где действие препарата может носить негативный характер, тем больший, чем большая доза использовалась. При этом лекарственное вещество достигает своих биологических мишеней в концентрации, значительно меньшей по сравнению с необходимой терапевтической, что вынуждает использовать дозы, которые на один–два порядка превышают теоретически необходимые [11].

Современная медицина стремится к тому, чтобы конкретно лечить пораженные ткани или органы. Однако большинство современных лекарственных средств не могут дать должного эффекта из-за их ограниченной избирательности и последующих побочных эффектов «вне цели». Целенаправленная терапия наведена на повышение избирательности терапевтических эффектов и снижение неблагоприятных побочных эффектов. Одним из подходов к достижению этой цели является использование специфических для болезни лигандов, которые направлены конкретно на пораженные ткани или органы [12]. Аптамеры являются привлекательным классом молекул–носителей из-за химической гибкости и способности высокого связывания с конкретной мишенью. На сегодняшний день успешно разработаны различные системы аптамеров–носителей и системы аптамер–наночастицы, в которых наночастицы функционируют

совместно с аптамерами для целенаправленной доставки или широкого спектра терапевтических средств. Поэтому аптамер–опосредованная доставка лекарств представляет собой мощный инструмент для безопасного и эффективного лечения различных патологий человека, включая рак; неврологические заболевания; иммунологические заболевания и т.д. [13].

1.2 Хронические неврологические болезни

Нервная система отвечает за работу и взаимосвязь всех систем и органов человеческого организма. Она объединяет центральную нервную систему, состоящую из головного и спинного мозга, и периферическую нервную систему, куда входят нервы, отходящие от головного и спинного мозга. Нервные окончания обеспечивают двигательную активность и чувствительность всех участков нашего тела. Отдельная автономная (вегетативная) нервная система инвертирует сердечно–сосудистую систему и другие органы [14]. Нарушение функциональной активности мозга вследствие врожденной патологии или физического воздействия нарушает метаболизм всего организма.

Заболевания нервной системы включают в себя десятки самостоятельных патологий и синдромов. Зачастую данные болезни характеризуются хроническим течением [15].

Основные хронические заболевания нервной системы можно разделить на:

- 1) врожденные аномалии;
- 2) энцефалопатии и миелопатии — невоспалительные заболевания головного и спинного мозга различной этиологии. Наиболее часто встречаются сосудистые (ишемические) и посттравматические энцефало– и миелопатии;

- 3) наследственные заболевания с преимущественным поражением экстрапирамидной, мозжечковой и пирамидной систем;
- 4) наследственные болезни метаболизма с поражением нервной системы;
- 5) множественный и боковой амиотрофический склероз;
- 6) поражение периферической нервной системы – невралгии краниальных нервов, радикулопатии, поли– и мононевропатии, рефлекторные синдромы остеохондроза позвоночника;
- 7) вегетативная дистония;
- 8) эпилепсия;
- 9) мигрень, пучковая головная боль и головная боль напряжения;
- 10) поражения нервной системы при патологии внутренних органов;
- 11) нервно–мышечные заболевания [16].

1.2.1 Эпилепсия

Эпилепсия является одним из самых распространенных неврологических заболеваний. Данной болезнью страдают около 50 миллионов человек во всем мире. Из–за такого глобального масштаба болезнь остается важнейшей проблемой психиатрии, неврологии и нейрохирургии [17]. Эпилепсия разнообразна, имеет более 15 различных типов приступов и более 30 эпилептических синдромов. С ней связаны сопутствующие болезни, включая депрессию, беспокойство, нервозность [18].

Эпилепсия представляет собой хроническое расстройство, которое определяется спонтанными рецидивирующими судорогами, или, по–другому, эпилептическими приступами, носящими фиксированный и продолжительный характер. Данному состоянию сопутствуют тонико–клонические судороги дыхательной мускулатуры, аспирация слюны и крови

из ротовой полости, а также задержки и аритмии дыхания [19].

Терапия при эпилепсии зачастую включает в себя длительный (часто пожизненный) прием противоэпилептических препаратов (ПЭП). В течение последних трех десятилетий введение более 15 противоэпилептических препаратов третьего поколения, которые дали врачам и пациентам больше возможностей для лечения многих видов приступов. Однако, хотя примерно 70–80% пациентов с врожденной эпилепсией в конечном итоге вступают в ремиссию с текущими ПЭП, эти препараты не контролируют судороги у 20–30% пациентов [20].

До 40% страдающих от эпилепсии – женщины детородного возраста. Для матерей–эпилептиков особенно опасным является то, что им приходится принимать ПЭП в больших дозах во время беременности. Прием ПЭП–медикаментов (например, вальпроата) может приводить к нарушениям развития эмбриона — так называемый фетальный вальпроатный синдром, который приводит к структурным дефектам почти всех систем организма, отставанию в развитии и умственной неполноценности [21].

1.2.2 Эпилептогенез

Эпилептогенез — это перестройка нейронных контуров, в результате которой образуется очаг с повышенной возбудимостью. Эпилептогенез развивается на уровне нейроглиального комплекса при определенной роли эпилептического нейрона. Эпилептический нейрон характеризуется нестабильностью мембраны, выраженной тенденцией к ее деполяризации, лабильностью мембранного потенциала [22].

Трансмиттером, играющим роль передатчика возбуждения в ЦНС в парасимпатической нервной системе, в нервно — мышечных синапсах является ацетилхолин. Особое значение в передаче эпилептического возбуждения имеют возбуждающие нейротрансмиттеры — глутамат и

аспартат [23]. Основным тормозным нейротрансмиттером является ГАМК (гамма–аминомасляная кислота).

Нейротрансмиттерами, передающими возбуждение или торможение в зависимости от типа нейронов, являются дофамин, адреналин, норадреналин, серотонин и т.д. [24].

1.2.3 Механизм эпилептогенеза

Формирование эпилептической активности связано с телами нейронов, а ее распространение (генерализация) с дендритами и мембранами. Главной является гипотеза о нарушении баланса между возбуждающими (глутамат, аспартат) и тормозными (ГАМК, таурин, глицин, норадреналин, дофамин, серотонин) медиаторами. Одной из основных причин деструкции нервных клеток является активация «глутаматного каскада», при которой происходит повышенное высвобождение глутамата. Избыток глутамата приводит к изменению глутаматных рецепторов. По ионным каналам начинает поступать Na^+ и Ca^{2+} внутрь клетки, а ионы K^+ выходят во внеклеточное пространство [25]. Это приводит к деполяризации мембраны – уменьшению разности потенциалов между внеклеточным и внутриклеточным пространством. При продолжающемся возбуждающем воздействии или при поступлении одновременного возбуждающего воздействия на нейрон от нескольких синапсов происходит суммация возбуждающего воздействия – деполяризация значительно увеличивается, а уровень возбуждения нейрона приближается к состоянию, в котором на клеточной мембране формируется потенциал действия, распространяющийся по аксону к другим нейронам.

Тормозные нейротрансмиттеры вызывают гиперполяризацию мембраны и активацию ферментов (фосфолипазы, протеазы и др.), накоплению арахидоновой кислоты. Данный процесс способствует усилению перекисного окисления липидов и деструкции клеточных мембран [26].

1.3 Противосудоржные лекарственные препараты

В качестве противосудорожных средств применяются лекарства различных фармакологических групп, которые ослабляют процессы возбуждения или усиливают процессы торможения в центральной нервной системе [27].

Известны три наиболее вероятных механизма действия противоэпилептических средств.

1. Стимуляция ГАМК–рецепторов. Гамма–аминомасляная кислота – основной эндогенный центральный тормозной медиатор, поэтому стимулирование ГАМК–рецепторов приводит к усилению тормозящего влияния на центральную нервную систему и угнетению активности нейронов. Так действуют фенobarбитал, бензодиазепины, вальпроевая кислота.

2. Блокирование рецепторов глутамата или уменьшение его высвобождения из пресинаптических окончаний (ламотриджин). Поскольку глутамат является возбуждающим медиатором, блокада его рецепторов или уменьшение его количества приводят к снижению возбудимости нейронов.

3. Блокада ионных каналов (натриевых, калиевых) в нервных клетках, что затрудняет синаптическую передачу сигнала и ограничивает распространение судорожной активности [28].

Одним из широко применяемых противоэпилептических препаратов является вальпроевая кислота. Эффективность вальпроата (ВК) при лечении очаговых и генерализованных эпилепсий хорошо установлена. Препарат обладает широким спектром действия, хорошей переносимостью и доступен в качестве препарата для инъекций с 1993 года.

1.3.1 Вальпроевая кислота

Вальпроевая кислота — разветвленная короткоцепочечная жирная кислота, производным которой является валерьяновая кислота.

В человеческом мозге вальпроат изменяет активность нейротрансммитера гамма – аминомасляную кислоту (ГАМК), стимулируя ингибирующую активность ГАМК с помощью нескольких механизмов, включая ингибирование деградации ГАМК, ингибирование ГАМК Трансаминобутирата (АВАТ), усиление синтеза ГАМК. Кроме того, ВК ослабляет возбуждение, опосредованное N–метил–D–аспаратом, и блокирует каналы Na^+ и Ca^{2+} (зависимые от напряжения L типа CACNA1 типа C, D, N и F) [29].

ВК потенцирует γ –аминомасляную кислоту (ГАМК), её эргические функции в некоторых конкретных областях мозга, которые, как считается, участвуют в контроле за выделением и распространением приступов, увеличивая как синтез, так и высвобождение ГАМК. Кроме того, ВК уменьшает высвобождение эпилептогенной γ –гидроксимасляной кислоты и ослабляет нейронное возбуждение, вызванное рецепторами глутамата N–метил–D–аспартата (NMDA). Наконец, ВК также может оказывать прямое действие на возбудимые мембраны и изменять дофаминергические и серотонинергические нейротрансмиссии [30].

Недавно была установлена способность вальпроевой кислоты подавлять активность гистоновой деацетилазы путем воздействия на транскрипцию гена. Вальпроевая кислота ингибирует деацетилирование гистонов и делает сайты транскрипции более доступными.

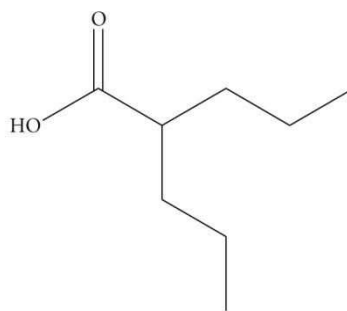


Рисунок 2 – Структура Вальпроевой кислоты

Вальпроевую кислоту и препараты на ее основе используют как эффективное лекарственное средство при лечении неврологических расстройств, невропатической боли, социальных фобий, а также для лечения мигрени. В последнее время активно изучают препарат как активатор сигнальных путей при лечении раковых заболеваний. Однако, как и другие противоэпилептические препараты вальпроевая кислота обладает высоким уровнем токсичности [31].

Есть данные о пациентах, у которых после лечения вальпроевой кислотой развивалась гипераммониемия (патология, связанная с печеночной недостаточностью), которая при длительном развитии перерастает в энцефалопатию [32].

Неоднократно, в статьях, сообщалось о влиянии вальпроевой кислоты на плод у беременных женщин. Риск развития врожденных патологий плода с фонового уровня 1–2% у здоровых женщин увеличивается до 4–9% у женщин, страдающих эпилепсией [33]. К пороку плода могут относиться такие заболевания, как: расщелины губы и неба, пороки сердца, расщелина позвоночника (*spina bifida*), гипоспадия, редукционные пороки конечностей, задержка внутриутробного развития плода, микрогнатия, микроцефалия и уrogenитальные аномалии. После рождения могут проявиться эпилепсия или задержка умственного развития [34].

Все эти данные говорят о том, что вальпроевая кислота, помимо своих, безусловно, положительных терапевтических качеств несет также сопутствующий негативный эффект на органы и ткани. Снижение токсического эффекта вальпроата можно добиться путем ее целенаправленной доставки в головной мозг. Однако существует проблема доставки препаратов в головной мозг из – за гематоэнцефалического барьера.

1.4. Гематоэнцефалический барьер

Гематоэнцефалический барьер является физиологической структурой, которая избирательно контролирует проникновение веществ, защищает мозг от инфекций и вирусов и отвечает за микроциркуляцию питательных веществ [35].

Уникальная структура и морфология ГЭБ ограничивает проникновение патогенов, токсичных химических веществ и продуктов обмена в нейроны, поддерживая тем самым целостность жизненно важных тканей [36]. Такая особенность ГЭБ является серьезной проблемой для доставки лекарств в ткани головного мозга для лечения неврологических заболеваний и расстройств [37].

Анатомическая структура ГЭБ складывается из плотных контактов эндотелиоцитов. Кроме эндотелиоцитов ГЭБ содержит перициты, астроциты и микроглию [38]. Сверху, над эндотелиоцитами выстилается слой белков фибронектина и ламинина со значительным количеством протеогликанов [39].

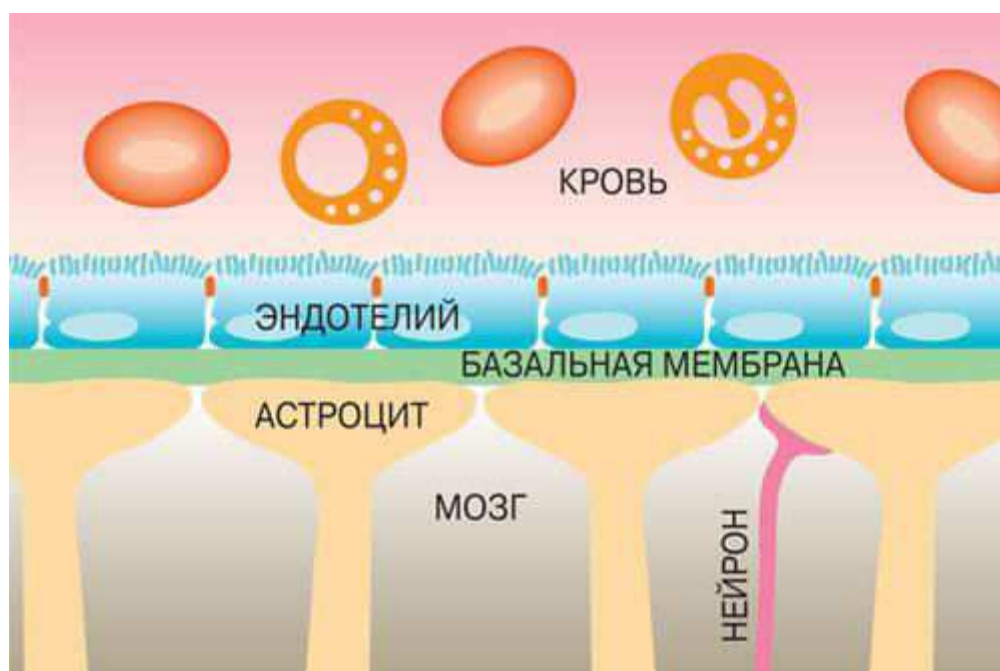


Рисунок 3 – Элементы гематоэнцефалического барьера

В качестве защитных структур ГЭБ выступают 3 основные системы:

1. Ферментативный барьер ГЭБ препятствует прохождению лекарственных препаратов и ксенобиотиков перед входом в эндотелиальные клетки капилляров. Ферментативную барьерную линию образуют щелочная фосфатаза, аденозинтрифосфатаза, нуклеозиддифосфатаза, ацетилхолинэстераза, 5'-нуклеотиды и другие.
2. Клеточный барьер, который образован клетками ГЭБ и межклеточными контактами. Эндотелиальные клетки ограничивают прохождение водорастворимых веществ, контролируют эндоцитоз и пиноцитоз.
3. Система ABC белков–переносчиков. К ним относятся около 48 отдельных переносчиков, классифицированных по 7 семействам (ABC–А, –В, –С, –D, –Е, –F и G). Из них наиболее изученным транспортером в ГЭБ является кодированный геном *ABCB1* Р–гликопротеин (Р–гр или MDR1), а также ABBC4 и ABCG2 (BCR–протеин) [40].

1.4.1 Эндотелиоциты

Эндотелиальные клетки представляют собой мезодермальные модифицированные плоскоклеточные эпителиальные клетки, которые образуют стенки кровеносных сосудов [41]. Основная структура ГЭБ образована эндотелиоцитами, которые морфологически отличаются от эндотелиальных клеток других органов и тканей. Главной функцией этих клеток в ГЭБ является транспортировка определенных питательных веществ в центральную нервную систему, а также удаление отходов из ЦНС в кровь. Эндотелиоциты жестко регулируют движение ионов и молекул между кровью и мозгом, ограничивают проникновение потенциально нейротоксичных компонентов плазмы, клеток, крови и патогенов, и экспрессируют множественные специфические для субстрата транспортные системы.

Такой избирательной сортировки также способствуют плотные контакты, образованные набором белков. Плотные контакты расположены между эндотелиальными клетками и функционально заметно уменьшают диффузию молекул через сосуд [42].

1.4.2 Перициты

Перициты являются удлинёнными клетками, которые располагаются вдоль кровеносного сосуда и образуют сетчатые контакты с эндотелиоцитами и аксонами симпатических нейронов. Помимо этого, перициты также взаимодействуют с другими элементами нейрососудистой части с помощью аутокринных и паракринных сигнальных путей. Эти актин–экспрессирующие клетки играют важную роль в образовании новых кровеносных сосудов, осаждении внеклеточного матрикса, заживлении ран, регуляции инфильтрации иммунных клеток и регуляции кровотока в ответ на

нейронную активность. Есть данные о том, что они также могут быть мультипотентными стволовыми клетками ЦНС [43].

Перициты мозга обладают значительным набором функций, основными из которых являются:

1. Функция сокращения: перициты головного мозга экспрессируют α -гладкомышечный актин, который несет сократительную функцию и участвует в регулировке кровотока.

2. Иммунная и фагоцитарная функция: перициты мозга обладают способностью секретировать антиген Т-лимфоцитам на иммунный ответ. Кроме этого перициты выполняют фагоцитарную функцию.

3. Миграционная функция: движение перицитов к эндотелиальным клеткам при сосудистом развитии опосредуется рецептором PDGF- β . Доказано, что после черепно – мозговой травмы примерно 40% микрососудистых перицитов головного мозга мигрируют из микрососудистого в периваскулярное положение [44].

1.4.3 Астроциты

Астроциты являются преобладающим типом глиальных клеток в центральной нервной системе и морфологически имеют звездообразную форму с многочисленными отростками. Данный тип клеток в значительной степени влияет на структуру и целостность нейрососудистой системы и поэтому является одним из важных компонентов ГЭБ [45]. Хорошо известно, что астроциты участвуют в питательной и метаболической поддержке нейронов. Это подчеркивается тесными контактами астроцитарных отростков с эндотелиальными клетками в стенках капиллярных сосудов и связью с нейронами. Таким образом, астроциты способны транспортировать питательные вещества к сосудам, поддерживающим нейронную функцию.

Астроциты образуют контакты с микрососудами и синапсами между нейронами и играют важную роль в регуляции переноса кислорода и глюкозы с кровотока в нейроны. Кроме того, отростки астроцитов регулируют водный транспорт, о чем свидетельствует поляризованная экспрессия аквапорина-4. Астроциты экспрессируют AQP4 исключительно на своих отростках, чтобы регулировать гомеостаз воды на границе сосуда и нейрона [46].

Астроциты участвуют в формировании ГЭБ за счет усиления образования плотных соединений и образования специализированных ферментных систем. Другими немаловажными функциями астроцитов являются секреция таких регуляторных факторов, как фактор роста- β (TGF- β), нейротропный фактор глиального происхождения (GDNF) и фактор роста фибробластов (FGF). Есть мнение, что астроциты регулируют различные физиологические функции ГЭБ с помощью секретируемых факторов, в том числе влияют на проницаемость ГЭБ, что приводит к образованию плотных соединений и экспрессии белков в эндотелиальных клетках [47].

1.4.4. Нейроны

Нейроны — характерные структурные элементы нервной системы, которые объединены в сети и специализированные структуры ганглий или мозга. Взаимодействие между эндотелиальными клетками и нейронами играет важную роль в нейрососудистой сети. Нейроны могут регулировать функцию ГЭБ путем экспрессии ферментов ГАМК и Na^+ , K^+ -АТФазы [48].

1.4.5 ABC– белки–транспортеры

Обеспечение защиты центральной нервной системы от воздействия химических веществ и токсинов поддерживается плотными соединениями

между эндотелиальными клетками и широким спектром транспортных белков. Наиболее важными транспортерами, которые ограничивают проницаемость гидрофобных веществ липофильной и амфифильной природы через ГЭБ являются эффлюксные ABC – белки. Мембранные АТФ – зависимые ABC – белки локализованы на эндотелиальных клетках и обращены внутрь сосуда. Среди данных белков можно отметить Р-гликопротеид, ABCG2 и семейство ABCC, которое включает MRP1 и MRP2. Эти транспортные протеины отвечают за нейрозащиту, ограничивая проникновение в мозг нейротоксинов. Кроме этого, данные белки могут ограничить ввод многих терапевтических средств и способствовать фармакорезистентности ЦНС [49].

Р-гликопротеин (Р-gr) представляет собой гликопротеин (ген MDR1), который высоко экспрессируется на мембране эндотелиальных клеток. Р-gr является одним из самых важных белков – переносчиков в ЦНС, который играет решающую роль как в нейропротекции, так и в лекарственной устойчивости. Он ограничивает проникновение экзогенных молекул и терапевтических средств в мозг и активно выводит цитостатики [50].

Следующим немаловажным эффлюксным белком является ABCG2, он также экспрессируется на мембране эндотелиоцитов и действует совместно с Р-гликопротеином. Он препятствует прохождению ксенобиотиков, а также некоторых лекарственных и химиопрепаратов внутрь кровеносных сосудов.

Семейство белков ABCC обладает устойчивостью к множественным лекарственным препаратам. Данное семейство включает девять членов, участвующих в избирательном транспорте веществ. Среди них наиболее изученными являются MRP1, MRP2 и MRP4. Они имеют локализацию в капиллярах мозга на эндотелиоцитах. MRP1 обнаруживается на просветных и внутренних мембранах капиллярного эндотелия. Экспрессия MRP1 была зарегистрирована в астроцитах и клетках глиобластомы, полученных от пациентов с эпилепсией [51]. MRP2 экспрессируется на внешней стороне

клеточной мембраны капиллярного эндотелия. Кроме того, экспрессия MRP2 была обнаружена в астроцитах и перицитах. Функциональная активность данного семейства белков заключается во множественной лекарственной устойчивости [52].

1.5 Транспорт веществ через гематоэнцефалический барьер

Вещества могут пересекать ГЭБ двумя основными путями. Первым является парацеллюлярный перенос, который включает в себя прохождение веществ между эндотелиальными клетками через плотные контакты. Второй путь прохождения ГЭБ предполагает перенос веществ по средствам пассивного и активного транспорта и называется трансцеллюлярным переносом.

Пассивный транспорт молекул происходит через эндотелиальную клетку по концентрационному или электрохимическому градиенту, при этом затрат энергии не происходит [53]. Данный перенос регулируется физико-химическими свойствами, такими как молекулярная масса, электрический заряд и липофильность, и обычно он ограничен небольшими липофильными молекулами, размер которых меньше 500 дальтон. Активный транспорт идет по более сложному механизму против градиента уже с затратой энергии. Проницаемость плотных контактов напрямую зависит от метаболизма эндотелиальных клеток, поэтому вещества при парацеллюлярном переносе обычно плохо проходят при данном виде транспорта. [54]. Помимо вышесказанных транспортных систем, существует более крупные и менее липофильные механизмы, которые необходимы для прохождения питательных веществ и белков. К ним относятся опосредованные носители (СМТ), рецепторно-опосредованный транцитоз (RMT) и адсорбционно – опосредованный транцитоз (AMT) [55].

1.6. Проблемы доставки лекарственных препаратов в мозг через гематоэнцефалический барьер

Большинство лекарственных препаратов, направленных на лечение заболеваний ЦНС не пересекают ГЭБ из – за высокодифференцированной системы переноса. Средняя молекулярная масса активного вещества, проходящего, через ГЭБ в ЦНС составляет 357Да. По результатам исследования только 12% от всех лекарственных средств направленного действия активно поступают в ЦНС, и только 1% от всех препаратов эффективно доставляются в мозг при аффективных расстройствах [56].

Малые молекулы обычно пересекают ГЭБ в фармакологически значимых количествах, если:

- 1) молекулярная масса лекарственного средства составляет более 400–500 Да
- 2) лекарственное средство образует менее 8– 10 водородных связей [57].

Перенос происходит через капиллярный эндотелий мозга, влияющий на доступность лекарственного средства в теоретически соответствующей концентрации [58]. Кроме того, те немногие лекарственные средства, которые способны пересекать ГЭБ, активно переносятся обратно в сосудистую сеть с помощью переносчиков оттока, таких как Р–гликопротеин 1 и других белков семейства ABC, связывающиеся с АТФ [59]. Эти активные транспортеры оттока могут распознавать широкий спектр соединений (более 60% всех лекарств) и способствовать высокой лекарственной резистентности. Также, в исследованиях зарубежных авторов говорится о том, что данный класс белков способствует метаболической деградации. Это играет большую роль в уменьшении накопления препаратов в мозге [60].

Также основными причинами терапевтических неудач при лечении заболеваний ЦНС являются более медленное действие лекарственного

средства, меньшее поглощение в нейрональных и других клетках головного мозга, превращение молекулы лекарственного средства в не взаимодействующий метаболит и связь молекулы лекарственного средства с другими лигандами, в основном белками, которые не являются переносчиками по своей природе. Хотя препарат остается терапевтически доступным в биологической системе, он становится неэффективным или достигает некоторой активной молекулярной формы или превращается в высокореактивное молекулярное состояние в головном мозге. Это основная причина, по которой, когда препарат проходит через барьер, он может прилипать к нежелательному белку в больших количествах [61]. Проблема может быть также вызвана наличием некоторых катаболических ферментов, которые производят ткани мозга, которые могут изменить нативную форму препарата или расщепить его на неактивную молекулу. Существует вероятность того, что активное лекарственное средство может превратиться в молекулу лекарственного средства с медленным воздействием, которая может разрушиться, когда она попадает внутрь ткани мозга или каталитической активности фермента, что делает ее бесполезной [62].

Поэтому, в настоящее время, идут активные исследования в разработках ряда стратегий для преодоления ГЭБ и улучшения доставки терапевтических агентов в мозг. Они варьируются от нарушения самого барьера до модификации транспортируемых агентов и их носителей. Альтернативная стратегия заключается в том, чтобы доставлять лекарства непосредственно в мозг с помощью различных маршрутов, которые полностью обходят ГЭБ [63]

2. Материалы и методы

2.1 Объекты исследования

В данном эксперименте использовались аптамеры Brain 1 и Co451 специфичные к гематоэнцефалическому барьеру и полученные с помощью процедуры SELEX ранее. Биотинилированные праймеры, комплементарные к 3' и 5' концам и флуоресцентный белок стрептавидин. Также был использован противоэпилептический препарат «Конвулекс» для внутривенного введения на основе вальпроата натрия.

В исследовании были задействованы мыши аутбредной популяции ICR с массой тела ± 30 грамм, полученные в питомнике Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор». Все манипуляции производились в строгом соответствии с этическими нормами проведения исследований над лабораторными животными согласно приказу МЗ СССР от 12.08.77 N 755 и Локального этического комитета КрасГМУ

2.2 Методика связывания аптамер со стрептавидином

Аптамеры Brain 1 и Co 451 в количестве 0,8 нмоль смешивали с биотинилированным праймером в количестве 0,8 нмоль, комплементарный к 3'– концу. Далее, для принятия правильной конформации, аптамеры с праймером нагревали на амплификаторе до 95°C 10 минут и охлаждали на льду 10 – 15 минут. Флуоресцентный белок стрептавидин в концентрации 0,2 мг/мл брали в 3 раза меньше, чем биотинилированных аптамер. Так как стрептавидин имеет 4 сайта связывания с биотином, 3 сайта занимается биотинилированными аптамерами, а один сайт – флуорофором. Инкубировали биотинилированные аптамеры с белком 30 минут на шейкере при 250 об/мин.

2.3 Методика отчистки органов животных от крови транскардиальной перфузией

Для контроля над транспортом белка стрептавидина и вальпроевой кислоты, перед исследованием проводилась обязательная перфузия с заменой крови в сосудах головного мозга мыши на фосфатный буфер.

Перед началом перфузии вводили мыши в качестве анестезии 150 мкл 15% хлоргидрата. Затем проверяли, находится ли мышь в сознании. Мышь должна находится в состоянии полного обездвиживания. Фиксировали животное в спинном положении с направленными в стороны и укрепленными передними и задними конечностями. Шерсть животного по линии разреза обрабатывают дезинфицирующим раствором. Оттягивали складку кожи мыши пинцетом в месте окончания грудной клетки и делали «V» образный надрез кожи, далее углубляли разрез до лопаток. Затем оттягивали диафрагму и делали надрез, разрез брюшной стенки делали под линией диафрагмы и по белой линии до лонной кости. Треугольник брюшной стенки отводили в сторону и фиксировали, обнажая сердце. Грудную полость оттягивали и фиксировали пинцетом с зажимом в месте головы мыши. Аккуратно делали надрез в правом предсердии. В левый желудочек вставляли иглу перфузионной системы и медленно открывали систему, для подачи фосфатного буфера, содержащего Ca^{2+} и Mg^{2+} .. Обмывание сосудов мозга и других органов визуально оценивали поступающей из надреза правого предсердия жидкости. Наличие белизны в глазах мыши свидетельствовало о полной замене в сосудистом русле крови фосфатным буфером. После этого извлекали мозг, печень и почки мыши.

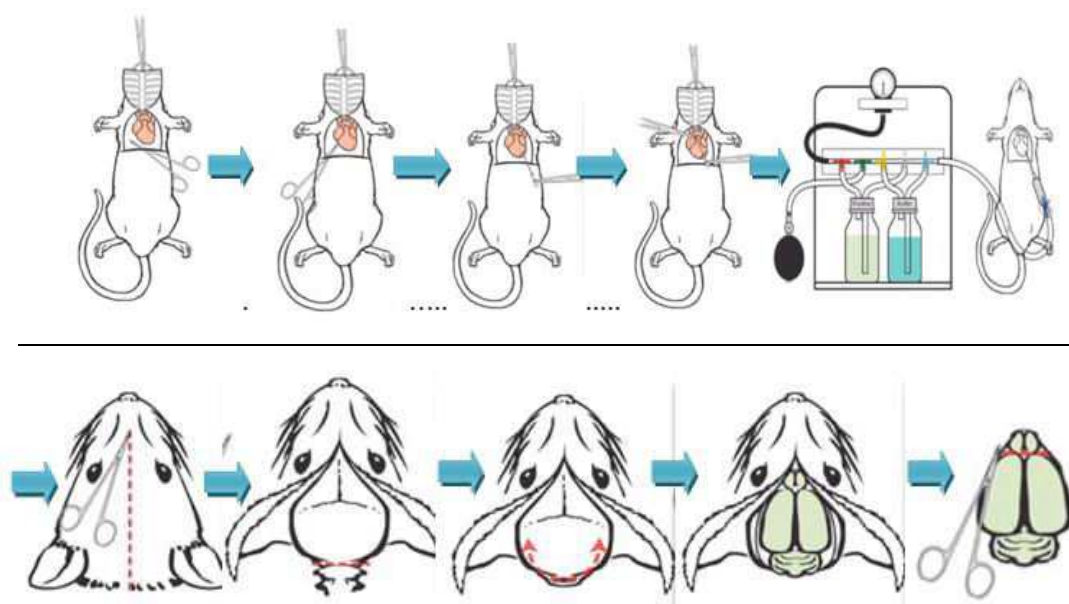


Рисунок 4 – Схема перфузии головного мозга мышей

2.4 Методика изготовления гистологических криосрезов для оценки прохождения белка через ГЭБ мыши

Прохождение белка— стрептавидина через ГЭБ оценивали с помощью гистологических срезов. В хвостовую вену мышам вводили комплекс биотинилированных аптамеров с флуоресцентным белком стрептавидином и по истечению часа делали перфузию. Далее у мышей забирали мозг и разделяли одно полушарие мозга от другого сагиттальным разрезом, отмывали дважды на шейкере по 5 минут при 270 оборотов в минуту в 2 мл 0,2% раствора Тритона. Затем при таких же условиях мозг дважды отмывали в фосфатном буфере, содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Срезы готовили на криостате Microm HM525 Cryostat при температуре -25°C , подготовленные срезы аккуратно помещали на полилизинные стекла, капали по 5 мкл матирующей среды и накрывали покровным стеклом.

Полученные образцы исследовали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss). Фотографии

обрабатывались с использованием программы для обработки и анализа изображения Zeiss Efficient Navigation (ZEN) Carl Zeiss (Германия).

2.5 Методика электрофореза на агарозном геле

Связывание комплекса аптамера с белком и дальнейшего его связывания с вальпроевой кислотой оценивали с помощью электрофореза. Электрофорез проводился на 3%-ном агарозном геле. Образцы раскапывали на парафиновую бумагу и смешивали с буфером GelPilot DNA Loading Dye, bromophenol blue. Заливали в электрофорезную установку TAE – буфер с красителем Midori Green DNA Stain и клали в буфер агарозный гель. После этого исследуемые образцы аккуратно наносили в лунки. Электрофорез проводили при напряжении 140 V в течение 30– 45 мин. По истечению времени выключали электрофорезную установку и оценивали результат с помощью флуоресцентной гель – документирующей системы Syngene G Box.

2.6 ПЦР– амплификация аптамер

С агарозного геля вырезались флуоресцентные полосы комплекса аптамера с белком и комплекса аптамера с белком и ВК. Далее методом фильтрации выделялась ДНК и проводилась амплификация.

Для проведения симметричной ПЦР использовали 5 мкл пула аптамеров в TE буфере и 45 мкл реакционной смеси, содержащей: 1X ПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂, 0,025 Ед/мкл KAPA2G HotStart Robust polymerase (KAPABiosystems, USA), 220 мкМ dNTPs, 300 нМ прямого праймера (5'– CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG– 3'), и 300 нМ обратного праймера (5'– GGC TTC TGG ACT ACC TAT GC– 3'). В асимметричной реакции для получения одноцепочечной ДНК в ПЦР– реакции концентрация прямого праймера была в 20 раз выше, чем обратного. Для реакции брали 5 мкл

симметричного ПЦР– продукта с 45 мкл асимметричной ПЦР– смеси: 1X ПЦР буфер, 2,5 mM MgCl₂, 0,025 Ед/мкл KAPA2G HotStart Robust polymerase, 220 мкМ dNTPs, 1 мкМ прямого праймера с меткой или без метки (5'– /метка / CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG– 3'), и 50 нМ обратного праймера (5'– GGC TTC TGG ACT ACC TAT GC– 3'). Амплификацию проводили по следующей программе: предварительный нагрев 2 минуты при 95°C, далее 15 циклов – 30 секунд при 95°C, 15 секунд при 56,3°C и 15 секунд при 72°C. Наличие ПЦР– продукта контролировали с помощью 3% агарозного гелеэлектрофореза. Концентрацию одноцепочечных ДНК– аптамеров в выбранных пулах определяли на спектрофотометре Nanodrop 2000 Thermoscientific или NanoVue plus (GE Healthcare, Life Sciences, USA).

2.7 Методика приготовления стандартов из гомогенатов органов для построения калибровочной кривой хроматографа

Извлеченные после перфузии органы (мозг, печень и почки) взвешивали на аналитических весах OHAUS «Pioneer» и из каждого органа готовили образец массой 200 мг. Извлеченные органы раскладывали по разным эппендорфам объемом 1,5 мл и добавляли к стандарт вальпроевой кислоты в концентрации 0,1 мг/мл. Органы раскладывали по разным эппендорфам объемом 1,5 мл, и «затравливали» органы стандартом вальпроевой кислоты в концентрации 0,1 мг/мл. Каждый стандарт, кроме четвертого (0 мкл вальпроевой кислоты) делали в трех повторностях. Для первого стандарта мозга добавляли 40 мкл вальпроевой кислоты, для второго стандарта добавляли 20 мкл, для третьего стандарта мозга добавляли 10 мкл и для четвертого стандарта добавляли 0 мкл вальпроевой кислоты. Такие же манипуляции проводили с печенью и почками. Инкубировали все стандарты 10 – 15 минут на шейкере при комнатной температуре на 250 об/мин. Добавляли к стандартам 200 мкл фосфатного буфера, содержащего Ca²⁺ и

Mg²⁺ и ставили на 15 минут в холодильник на – 80 °С для первичного лизиса клеток ткани. Размораживали стандарты и суспензировали органы в гомогенизаторе. Ставили откручиваться гомогенат на 13400 об/мин на 15 мин. Снимали супернатант.

Полученные образцы относили на газовую хроматографию и строили по полученным данным калибровочные прямые.

2.8 Оценка связывания вальпроевой кислоты с белком стрептавидином методом фильтрации

В качестве вальпроевой кислоты был использован препарат «Конвулекс» в концентрации 100 мг/мл и флуоресцентный белок стрептавидин FITC в концентрации 0,5 мг/мл. Данное исследование проводили в двух повторностях и двух временных промежутках. Смешивали в четырёх пробирках по 30 мкл (3 мг) вальпроевой кислоты с 22,5 мкл (0,011 мг) флуоресцентного белка. Инкубировали № 1,2 пробы в течение часа на шейкере при комнатной температуре на 250 об/мин. Инкубировали № 3,4 пробы в течение суток в холодильнике на шейкере при 250 об/мин. По истечению времени пробы заливали в Nanoser фильтры с пропускающей способностью 30 kDa. Откручивали на микроцентрифуге MiniSpin с охлаждающим режимом при 3000 об/мин в течение 1,5 часов. После это смывали с фильтров связавшиеся комплекс вальпроевой кислоты с белком 50 мкл фосфатным буфером, содержащим Ca²⁺ и Mg²⁺.

В образцах, смытых с фильтров, и осадке определяли концентрацию вальпроевой кислоты на газовом хроматографе.

2.9 Методика связывания пула аптамер со стрептавидином и вальпроевой кислотой

Расчёты производились на одну мышь. Смешивали 5 мкл (0,5 мг) препарат «Конвулекс» на основе вальпроата натрия в концентрации 100 мг/мл со 100 мкл (0,5 мг) белка стрептавидина в концентрации 5 мг/мл. Инкубировали в течение суток в холодильнике на шейкере при 250 об/мин.

Аптамеры Brain 1 и Co 451 в конечном количестве 0.8 нмоля смешивали с таким же количеством биотинилированных праймеров, комплементарных к 3' концу. Далее, для принятия правильной конформации, пул с праймером нагревали на амплификаторе до 95°C 10 минут и охлаждали на льду 10 – 15 минут. Инкубировали 30 минут на шейкере при 250 об/мин.

Смесь из пула аптамера с праймером и вальпроевой кислоты со стрептавидином инкубировали на шейкере 30 минут при 250 об/мин.

Далее мышей делили на 3 группы. В первую группу входили контрольные мыши, им в хвостовую вену вводили по 178 мкл 0,9% NaCl. Второй группе мышей в хвостовую вену вводили 178 мкл пул аптамеров со стрептавидином и ВК. Третьей группе мышей вводили вальпроевую кислоту в концентрации 0,5 мг, разведенную до 178 мкл 0,9% NaCl. Спустя один час всем группам мышей делали перфузию и извлекали мозг, печень и почки. Взвешивали органы на аналитических весах OHAUS «Pioneer». Разделяли органы так, чтобы вес каждого органа в каждой группе был 200 мг. Извлеченные органы помещали в разные эппендорфы объемом 1,5 мл и добавляли по 200 мкл фосфатного буфера, содержащего Ca^{2+} и Mg^{2+} .

Пробы ставили на 15 минут в холодильник глубокой заморозки (– 80 °C) для первичного лизиса клеток ткани. Органы размораживали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе. Центрифугировали гомогенат на 13400 об/мин 10 минут. Снимали супернатант и переносили в новые пробирки объемом 1,5 мл. Для исследования отделили супернатант и

переносили в новые пробирки объемом 1,5 мл. До исследования на хроматографе пробы хранились при -80°C .

3. Результаты и их обсуждение

Для повышения эффективности переноса вальпроевой кислоты через гематоэнцефалический барьер в головной мозг были получены конъюгаты для адресной доставки этого противоэпилептического препарата. В качестве вектора для направленного транспорта использовали ДНК– аптамеры, способные проходить через ГЭБ, которые были получены ранее в лаборатории Бимолекулярных и медицинских технологий КрасГМУ. Способы получения конъюгатов аптамеров с ВК подробно описаны в разделе материалы и методы.

3.1 Получение комплексов вальпроевой кислоты с аптамерами

На рисунке 5 схематично показано образование комплексов для транспортировки ВК в головной мозг.

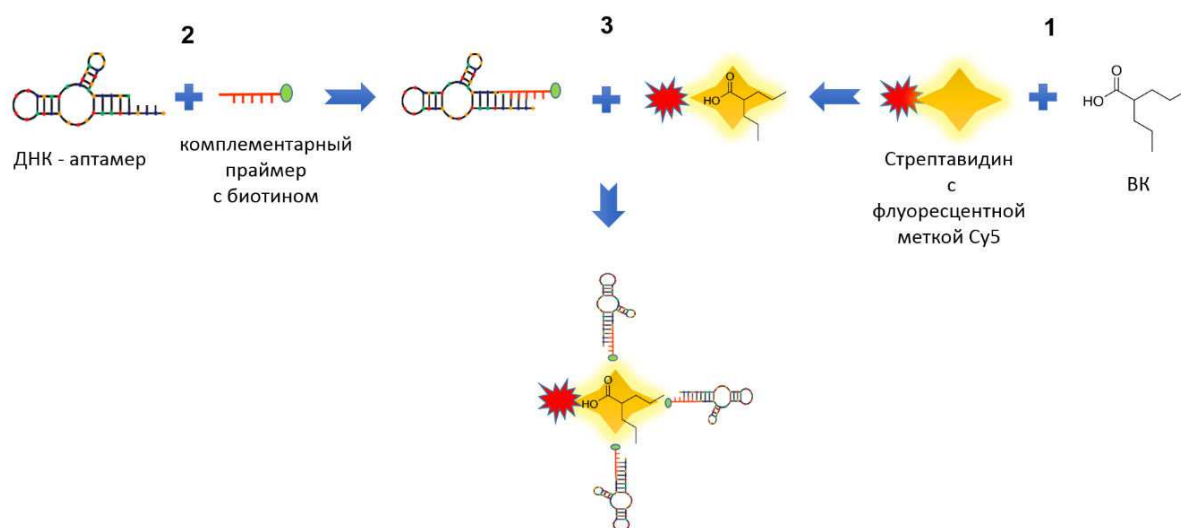


Рисунок 5 – Схема образования комплекса для доставки вальпроевой кислоты в головной

мозг. (1) образование комплекса флуоресцентно– меченого стрептавидина с вальпроевой кислотой; (2) образование комплекса ДНК– аптамера с биотинилированным комплементарным праймером за счет формирования двойной цепи комплементарных частей олигонуклеотида; (3) образование комплекса аптамер– стрептавидин– вальпроевая кислота за счет образования прочной связи биотин– стрептавидин

Вальпроевая кислота связывается со стрептавидином благодаря гидрофобным взаимодействиям. Для прочного связывания ВК инкубировали с белком в течение суток. В работе использовали немеченые аптамеры с доказанной ранее способностью проходить через ГЭБ в головной мозг мыши. Для формирования комплексов со стрептавидином их необходимо было функционализировать биотином. Для этого аптамеры смешивали 1:1 с биотинилированными олигонуклеотидами, комплементарными с 3' конца. После чего к комплексу стрептавидин – ВК добавляли биотинилированные ДНК – аптамеры, которые связывались со стрептавидином за счет образования устойчивой связи стрептавидин – биотин.

Анализ эффективности получения конъюгатов ВК с аптамерами проводили с помощью гель– электрофореза с последующей газовой хроматографией с масс– селективным детектором, ПЦР– амплификации и конфокальной микроскопии.

Агарозный горизонтальный гель– электрофорез проводили для разделения комплексов, при визуализации которых использовали флуоресцентный стрептавидин, меченый PE. Электрофорез показал образование комплексов: биотинилированных аптамеров со стрептавидином (дорожка 1); ВК со стрептавидином (дорожка 4), аптамера – ВК – стрептавидина (дорожка 5). Дорожки 2 и 3 – контрольные для свободной ВК и флуоресцентно– меченого стрептавидина.

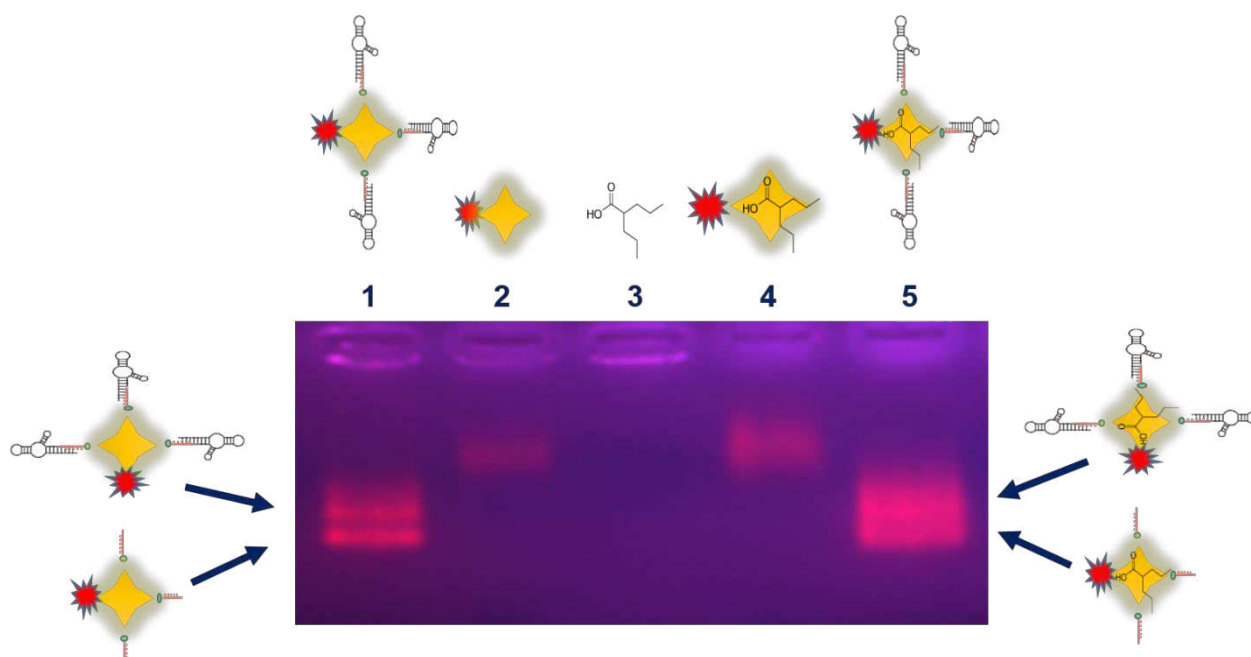


Рисунок 6 – Гель– электрофореграмма, показывающая комплексообразование: дорожка 1: аптамер – праймер – флуоресцентно– меченый стрептавидин; дорожка 2: флуоресцентно– меченый стрептавидин; дорожка 3: вальпроевая кислота; дорожка 4: комплекс флуоресцентно– меченый стрептавидин – вальпроевая кислота; дорожка 5: комплекс аптамер – праймер – флуоресцентно– меченый стрептавидин – вальпроевая кислота

На дорожке 1 (рисунок 6) видно разделение комплекса на 2 отдельные полосы с равной интенсивностью флуоресценции. Из этого следует, что комплексообразование идет с 50% выходом, при этом в равных пропорциях образуется 2 комплекса: аптамер–праймер–флуоресцентно– меченый стрептавидин (верхняя полоса, рисунок 6, дорожка 1) и праймер–флуоресцентно – меченый стрептавидин (нижняя полоса, рисунок 6, дорожка 1). Также и полный комплекс праймер – флуоресцентно– меченый стрептавидин – вальпроевая кислота разделяется на 2 комплекса, хотя полосы более размыты, возможно, благодаря тому, что разное количество молекул ВК связывается с молекулой стрептавидина, что делает полосу размытой как в контроле стрептавидин – ВК (рисунок 6, дорожка 2).

ПЦР– амплификация показала наличие аптамеров только в верхних

полосах на дорожках 1 и 5, что подтверждает наличие 2х комплексов аптамер–праймер–флуоресцентно– меченый стрептавидин (верхняя полоса, рисунок 6, дорожки 1,5) и праймер–флуоресцентно– меченый стрептавидин (нижняя полоса, рисунок 6, дорожки 1,5).

Анализ наличия вальпроевой кислоты в препаратах проводили с помощью газовой хроматографии с масс – селективным детектором. Исследования показали наличие ВК в полосах на дорожках 3,4,5, что свидетельствует об успешном комплексообразовании. На дорожке 3 ВК осталась в месте ее нанесения и не сдвинулась. Следует отметить, что ВК была найдена на пределе обнаружения прибора из– за низкой исходной концентрации ВК в комплексе, поскольку для электрофореза используют малое количество комплекса. Поэтому оценить количественно эффективность связывания при таком подходе невозможно.

3.2 Оценка эффективного связывания вальпроевой кислоты со стрептавидином

Для оценки эффективности связывания ВК со стрептавидином, несвязавшуюся вальпроевую кислоту отделяли с помощью фильтрации с использованием 30 кДа фильтров Nanosep (Рисунок 7). Вальпроевая кислота, связавшаяся с белком стрептавидином (60 кДа) остаётся на фильтре (1 на рисунке 7) и не проходит через поры, а свободные молекулы фильтруются на дно пробирки. Концентрацию ВК после фильтрации определяли с помощью газовой хроматографии с масс– селективным детектором.

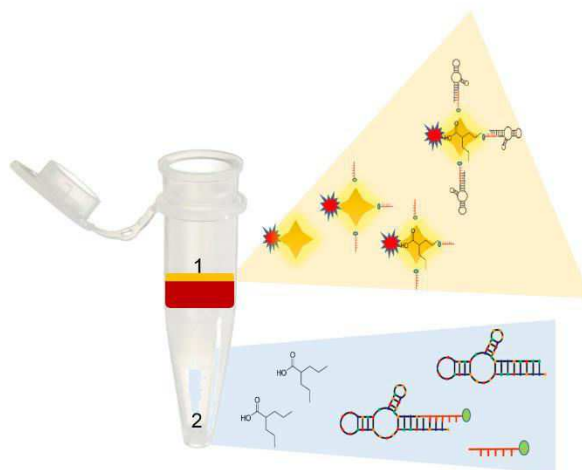


Рисунок 7 – Сепарация связанного комплекса вальпроевой кислоты – стрептавидина – аптамер от свободной ВК, аптамеров и праймеров: 1) связанный комплекс; 2) несвязавшиеся элементы комплекса

Результаты показали, что при инкубации 24 часа по сравнению с 1– часовой инкубацией, содержание ВК в комплексе увеличивается примерно в 2 раза (Таблица 1). При этом 1 молекула ВК связывается с 1 молекулой стрептавидина.

Таблица 1 – Определение эффективности комплексообразования вальпроевой кислоты со стрептавидином в зависимости от времени инкубации.

Проба	мг/мл
Свободная ВК в осадке Инкубация 1 час	2.26
Свободная ВК в осадке Инкубация 24 часа	2.08
ВК в комплексе со стрептавидином и ДНК Инкубация 1 час	0.27
ВК в комплексе со стрептавидином и ДНК Инкубация 24 часа	0.54

3.3 Оценка эффективности переноса аптамерами белка стрептавидина через гематоэнцефалический барьер

Для оценки эффективности переноса вальпроевой кислоты через гематоэнцефалический барьер флуоресцентно– меченые комплексы аптамеров со стрептавидином вводили мышам ICR в хвостовую вену. В качестве контроля использовали комплекс комплементарных праймеров со стрептавидином. Через 30 минут после введения животных усыпляли и проводили полную перфузию головного мозга для удаления крови из сосудов и заполнения их фосфатным буфером и с целью оценить перенос комплексов через ГЭБ в ткани мозга.

а
Co451-Стр-FAM

б
Brain 1- Стр- Cy5

в
Праймер-Стр-Cy3

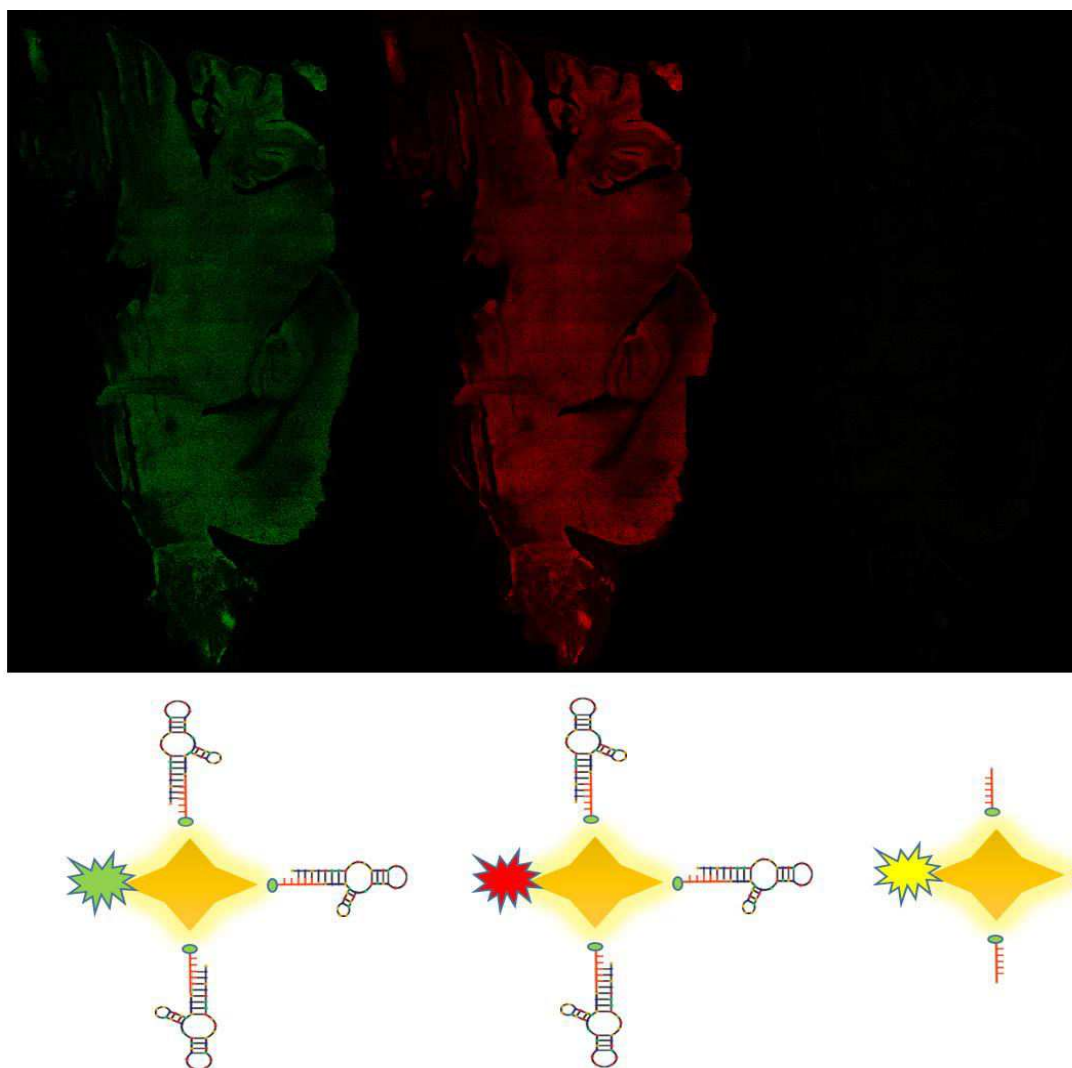


Рисунок 8 – Перенос флуоресцентно– меченого белка стрептавидина в головной мозг с помощью (а) аптамера Co451, (б) аптамера Brain 1, (с) праймера.

Из перфузированного головной мозга изготавливали тонкие срезы и исследовали их с помощью конфокальной микроскопии (Рисунок 8). Аптамеры Co451 и Brain 1 переносили белок стрептавидин через ГЭБ в головной мозг, поскольку наблюдалась флуоресценция соответствующих срезов, белок с праймером в головной мозг не прошел (Рисунок 8). Таким образом показано, что аптамеры способны проносить достаточно большой белок стрептавидин через ГЭБ в головной мозг.

3.4 Исследования транспорта вальпроевой кислоты в головной мозг

По литературным данным вся введенная вальпроевая кислота (87% – 95%) связывается с белками и метаболизируется, что приводит к низкому клиренсу, то есть к медленному очищению организма от лекарственного препарата (6– 20 мл / ч / кг) и дозависимой фармакокинетики (концентрация препарата нарастает или снижается быстрее, чем увеличивается или снижается доза).

Существует, по меньшей мере, три пути метаболизма VPA: глюкуронидирование, β - окисление в митохондриях (50 и 40% дозы) и окисление цитохрома P450 (~ 10%). Большая часть метаболизирования проходит в печени путем митохондриального β - окисления, с образованием большого количества гепатотоксичных метаболитов.

На рисунке 9 показано содержание ВК в головном мозге мышей после внутривенного введения свободной ВК и в комплексе с аптамерами в динамике. Поскольку нам пока не удалось избавиться от комплекса стрептавидин – ВК – праймер. Исходя из полученных ранее данных электрофореза и по данным полученным с помощью конфокальной микроскопии показано, что ВК, связанная в комплексах только с праймерами без аптамеров, в головной мозг не вошла. И действительно, при введении комплекса в головной мозг попало как минимум в 2 раза меньше вальпроевой кислоты, чем могло бы при более эффективном комплексообразовании. То есть получается, что если бы на всем стрептавидине были аптамеры, то в головной мозг ВК вошло бы минимум в 2 раза больше (Прямоугольники сверху на столбиках).

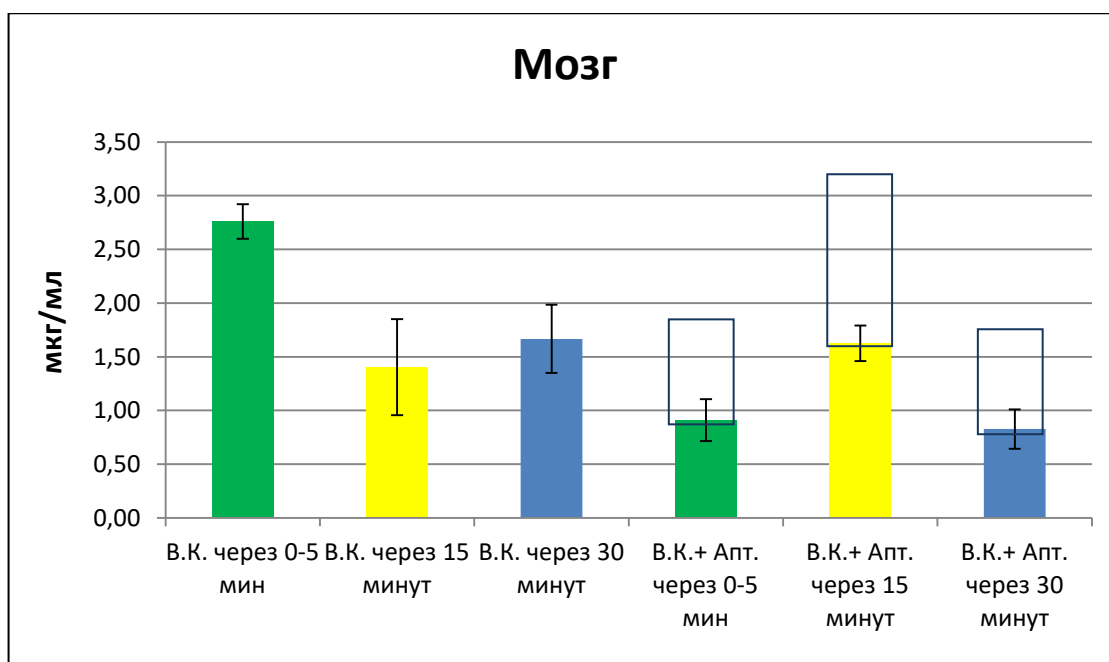


Рисунок 9 – Содержание вальпроевой кислоты в головном мозге мышей после введения свободной ВК и в виде комплекса с аптамерами в динамике.

Из рисунка 9 видно, что свободная ВК входит в головной мозг сразу же, но уже через 15 минут ее концентрация снижается в 2 раза и практически не меняется через 30 минут. Введение ВК в виде комплекса замедляет ее прохождение в головной мозг, содержание увеличивается плавно сразу входит половина и в течение 15 минут происходит накопление.

На рисунке 10 показано содержание вальпроевой кислоты в почках при введении её в свободном виде и в комплексе с аптамерами.

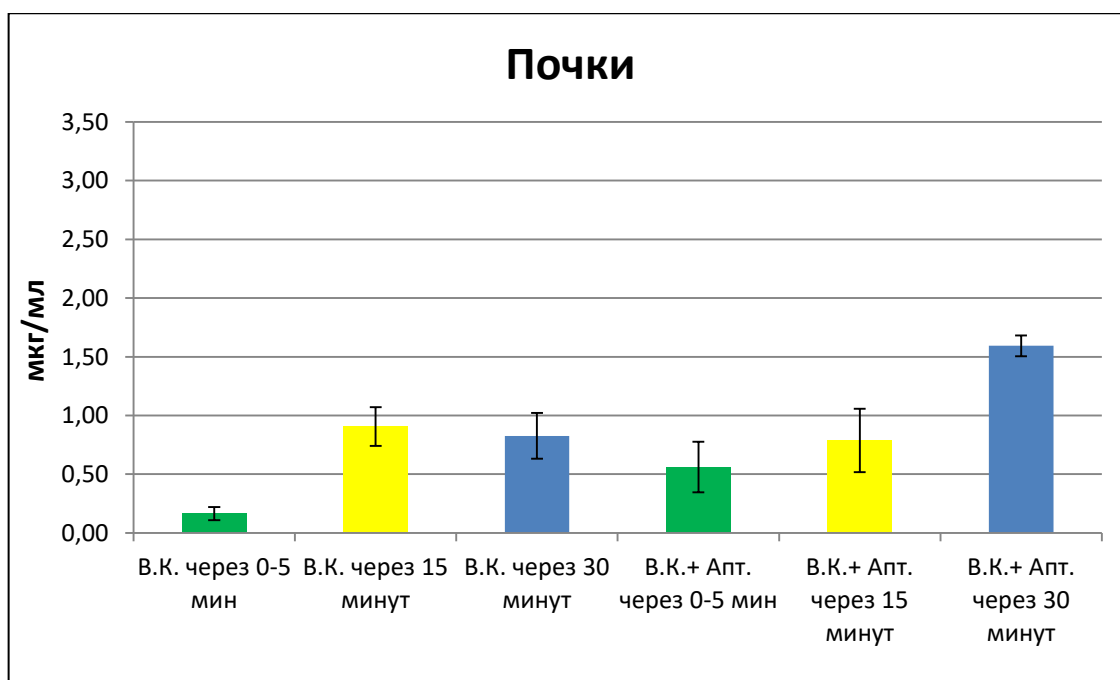


Рисунок 10 – Содержание вальпроевой кислоты в почках мышей после введения свободной ВК и в виде комплекса с аптамерами в динамике.

Из рисунка 10 видно, что динамика выведения немодифицированного лекарственного препарата из организма мыши достаточно низкая. Можно предположить, что вальпроевая кислота накапливается в других органах и метаболизируется, с образованием токсичных метаболитов. Модифицирование препарата аптамерами позволяет организму выводить лекарство уже через 30 минут после его внутривенного введения, тем самым, снижая токсический эффект на организм.

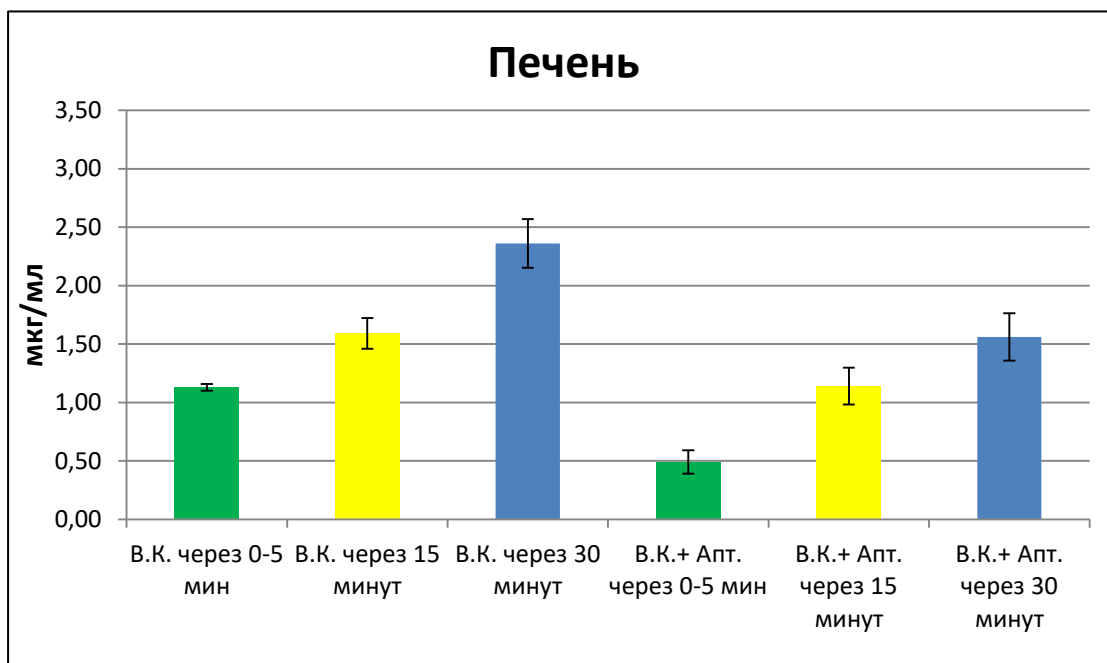


Рисунок 11 – Содержание вальпроевой кислоты в печени мышей после введения свободной ВК и в виде комплекса с аптамерами в динамике.

На рисунке 11 представлено содержание ВК в печени мышей после введения свободной ВК и в виде комплекса с аптамерами в динамике. Свободная ВК накапливается в печени, где, предположительно, метаболизируется митохондриальным β - окислением и образованием большого количества гепатотоксичных метаболитов. Однако введение препарата в комплексе с аптамерами значительно снижает концентрацию вальпроевой кислоты в печени и, тем самым в некоторой степени препятствует образованию токсичных метаболитов.

Полученные результаты показывают возможность создания комплексов для адресной доставки ВК в головной мозг, однако необходимо создание более эффективных конструкций для переноса. Эксперименты по введению животным свободной ВК и в комплексе с аптамерами свидетельствуют о том, что аптамер проносит этот препарат в головной мозг, однако недостаточно эффективно. Возможно избыточная концентрация ВК

взятая для эксперимента с целью ее хроматографического определения в маленьких по объему образцах тканей мыши не позволила оценить эффективность и селективность адресной доставки. Необходимы дальнейшие исследования для получения оптимальных конструкций для эффективной адресной доставки лекарственных препаратов в головной мозг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение большинства заболеваний головного мозга затруднено в связи с наличием гематоэнцефалического барьера, который жестко регулирует транспорт веществ из кровеносного русла в головной мозг и обратно. Большая часть лекарственных молекул не может преодолеть этот барьер и попасть к очагу заболевания по различным причинам. Помимо этого, многие, из числа лекарственных препаратов данной группы оказывают негативное и даже токсическое действие на органы и ткани.

Одним из способов решения данной проблемы является создание конструкций, состоящих из молекулы лекарственного препарата и транспортного вектора – молекулы, обеспечивающей их целенаправленную доставку в головной мозг с максимальным высвобождением. На сегодняшний день в качестве такого вектора рассматриваются белковые антитела и наночастицы. Однако, в данной роли транспортеров могут выступать аптамеры – олигонуклеотиды, обладающие рядом преимуществ.

Исходя из результатов проведенных нами исследований создание комплексов для адресной доставки лекарственных препаратов на основе аптамер в головной мозг и снижение токсического эффекта данных лекарств на другие органы и ткани возможно, однако необходимо создание более эффективных конструкций для переноса препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Комплекс вальпроевой кислоты с белком стрептавидином и ДНК–аптамерами, могут быть использованы для адресной доставки ВК в головной мозг. Использование биотинилированного аптамера без предварительной гибридизации с праймером позволит повысить эффективность препарата.
2. Разработан метод оценки эффективности адресной доставки комплекса ДНК – аптамеров с ВК в головной мозг мыши.
3. Показано, что аптамеры проносят ВК в комплексе с белком стрептавидином через ГЭБ в головной мозг мыши. Создание комплекса ускоряет процесс выведение вальпроевой кислоты из организма и снижает концентрацию гепатотоксичных метаболитов в печени.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВК – вальпроевая кислота

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновые кислоты

SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения

ГАМК – гамма – аминomásляная кислота

ПэП – противоэпилептические препараты

АВАТ – трансаминобутират

GDNF – нейротропный фактор глиального происхождения

FGF – фактор роста фибробластов

P-gr – P- гликопротеин

MRP1 – Множественный лекарственно - устойчиво ассоциированный белок 1

MRP2 – Множественный лекарственно - устойчиво ассоциированный белок 2

MRP4 – Множественный лекарственно - устойчиво ассоциированный белок 4

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Pardridge, W. Targeted delivery of protein and gene medicines through the blood–brain barrier / W. I. Pardridge // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2015. – V. 97. – №. 4. – P. 347–361.
2. Papademetriou, I. Promising approaches to circumvent the blood–brain barrier: progress, pitfalls and clinical prospects in brain cancer / I. T. Papademetriou, T. P. Porter // *Therapeutic delivery*. – 2015. – V. 6. – №. 8. – P. 989–1016.
3. Pulicherla, K. Targeting therapeutics across the blood brain barrier (BBB), prerequisite towards thrombolytic therapy for cerebrovascular disorders – an overview and advancements / K. K. Pulicherla, M. K. Verma // *AAPS PharmSciTech*. – 2015. – V. 16. – №. 2. – P. 223–233.
4. Marimuthu, C. Single–stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation / C. Marimuthu, T. H. Tang, J. Tominaga, S. C. Tan, S. C. Gopinath // *Analyst*. – 2012 – №137. – P. 1307–1315.
5. Давыдова, А. С. Эскорт –аптамеры: новые инструменты для направленной доставки лекарственных препаратов в клетки / А. С. Давыдова, М. А.Воробьева, А. Г. Веняминаова // *Acta. Nature*. –2011. – №3. – С. 13–31.]
6. Wang, P. The beauty and utility of DNA origami / P. Wang, T. A. Meyer, V. Pan, P. K. Dutta, Y. Ke // *Chem*. – 2017. – V. 2. – №. 3. – P. 359 – 382.
7. Ellington, A. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands / A. D. Ellington, J. W. Szostak // *Nature*. – 1990. – V. 346. – №. 6287. – P. 818.
8. Zhuo, Z. Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine / Z. Zhuo, Y. Yu, M. Wang, J. Li, Z. Zhang, J. Liu, B. Zhang // *International journal of molecular sciences*. – 2017. – V. 18. – №. 10. – P. 2142.
9. Zho, J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges / J. Zho, J. Rossi // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2017. – V. 16. – №. 3. – P. 181.
10. Gupta, S. Chemically modified DNA aptamers bind interleukin–6 with high affinity and inhibit signaling by blocking its interaction with interleukin–6 receptor

- / S. Gupta, M. Hirota, S. M. Waugh, I. Murakami, T. Suzuki, M. Muraguchi, C. Zhang // *Journal of Biological Chemistry*. – 2014. – V. 289. – №. 12. – P. 8706–8719.
11. Соснов, А. В. Разработка систем доставки лекарственных средств с применением микро–и наночастиц / А. В. Соснов, Р. В. Иванов, К. В. Балакин, Д. Л. Шоболов, Ю. А. Федотов, Ю. М. Калмыков // *Качественная клиническая практика*. – 2008. – №. 2.
 12. Zhu, G. Aptamer – drug conjugates / G. Zhu, G. Niu, X. Chen // *Bioconjugate chemistry*. – 2015. – V. 26. – №. 11. – P. 2186–2197.
 13. Catuogno, S. Aptamer–mediated targeted delivery of therapeutics: An update / S. A. Catuogno, C. L. Esposito, V. Franciscis // *Pharmaceuticals*. – 2016. – V. 9. – №. 4. – P. 69.
 14. Кравцов, Ю. И. Медицинская реабилитация в неврологии и нейрохирургии [Текст]: учеб. для вузов / Ю. И. Кравцов, В. А. Бронников, Ю. В. Каракулова, А. В. Крутень, Е. Г. Фурман, А. А. Белкин, Ю. А. Мавликаева – 1988 – С. 301–303.
 15. Gibbs, C. J. Chronic neurological diseases / C. J. Gibbs // *Viral Infections of Humans*. – Springer, Boston – 1989 – P. 781–806.
 16. Megiddo, I. Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent simulation model / I. Megiddo, A. Colson, D. Chisholm, T. Dua, A. Nandi, R. Laxminarayan // *Epilepsia*. – 2016. – V. 57. – №. 3. – P. 464–474.
 17. Voronkova, K. Modern principles of epilepsy therapy / K. V. Voronkova, O. A. Pylaeva, E. S. Kosiakova, O. V. Mazal'skaia, G. S. Golosnaia, M. A. Provatorova, A. S. Petrukhin // *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii imeni SS Korsakova*. – 2010. – V. 110. – №. 6. – P. 24–36.
 18. Tellez-Zenteno, J. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis / J. F. Tellez-Zenteno, S. B. Patten, N. Jetté, J. Williams, S. Wiebe, // *Epilepsia*. – 2007. – V. 48. – №. 12. – P. 2336–2344.

19. Brooks Kayal, A. Issues related to symptomatic and disease modifying treatments affecting cognitive and neuropsychiatric comorbidities of epilepsy / A. R. Brooks-Kayal, K. G. Bath, A. T. Berg, A. S. Galanopoulou, G. L. Holmes, F. E. Jensen, M. Patel // *Epilepsia*. – 2013. – V. 54. – №. 4. – P. 44–60.
20. Brodie, M. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy / M. J. Brodie, S. J. E. Barry, G. A. Bamagous, J. D. Norrie, P. Kwan // *Neurology*. – 2012. – V. 78. – №. 20. – P. 1548–1554.
21. Meador, K. Foetal antiepileptic drug exposure and verbal versus non-verbal abilities at three years of age / K. J. Meador, G. A. Baker, N. Browning, M. J. Cohen, J. Clayton– Smith, L. A. Kalayjian, D. W. Loring // *Brain*. – 2011. – V. 134. – №. 2. – P. 396–404.
22. Pitkänen, A. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets / A. Pitkänen, K. Lukasiuk // *The Lancet Neurology*. – 2011. – V. 10. – №. 2. – P. 173–18
23. Pitkänen, A. Epileptogenesis in experimental models / A. Pitkänen, I. Kharatishvili, H. Karhunen, K. Lukasiuk, R. Immonen, J. Nairismägi, J. Nissinen, // *Epilepsia*. – 2007. – V. 48. – №.2. – P. 13–20.
24. Willmore, L. Antiepileptic drugs and neuroprotection: current status and future roles / L. J. Willmore // *Epilepsy & Behavior*. – 2005. – V. 7. – P. 25–28.
25. Nissinen, J. A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat / J. Nissinen, T. Halonen, E. Koivisto, A. Pitkänen, // *Epilepsy research*. – 2000. – V. 38. – №. 2–3. – P. 177 – 205.
26. Rakhade S. N., Jensen F. E. Epileptogenesis in the immature brain: emerging mechanisms / S. N. Rakhade, F. E. Jensen // *Nature Reviews Neurology*. – 2009. – V. 5. – №. 7. – P. 380
27. Wyszynski, D. Antiepileptic drug pregnancy registry: increased rate of major malformations in offspring exposed to valproate during pregnancy / D. Wyszynski, M. Nambisan, T. Surve, R. Alsdorf, C. Smith, L. Holmes // *Neurology*. – 2005. – V. 64. – P. 956–61.

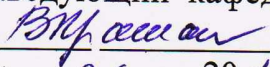
28. Hernández-Díaz, S. Anticonvulsants teratogenic mechanism involves alteration of bioelectrically – controlled processes in the embryo. A hypothesis / S. Hernández-Díaz, M. Levin // *Reproductive toxicology*. – 2014. – V. 47. – P. 111.
29. Brandt, C. Treatment with valproate after status epilepticus: effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats C. Brandt, A. M. Gastens, M. Zhen Sun, M. Hausknecht, W. Löscher // *Neuropharmacology*. – 2006. – V. 51. – №. 4. – P. 789–804.
30. Göttlicher, M. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells / M. Göttlicher, S. Minucci, P. Zhu, O. H. Krämer, A. Schimpf, S. Giavara, T. Heinzel // *The EMBO journal*. – 2001. – V. 20. – №. 24. – P. 6969– 6978.
31. Hardy, J. A phase II study to establish the efficacy and toxicity of sodium valproate in patients with cancer-related neuropathic pain / J. R. Hardy, E. A. Rees, B. Gwilliam, J. Ling, K. Broadley, R. A'Hern // *Journal of pain and symptom management*. – 2001. – V. 21. – №. 3. – P. 204 – 209.
32. Nicolai, J. Cognitive side effects of valproic acid-induced hyperammonemia in children with epilepsy / J. Nicolai, A. P. Aldenkamp, J. R. Huizenga, L. K. Teune, O. F. Brouwer // *Journal of clinical psychopharmacology*. – 2007. – V. 27. – №. 2. – P. 221–224
33. Kaneko, S. Congenital malformations due to antiepileptic drugs / S. Kaneko, D. Battino, E. Andermann, K. Wada, R. Kan, T. Takeda, A. Granata, // *Epilepsy research*. – 1999. – V. 33. – №. 2–3. – P.145–158.
34. Genton, P. Valproic acid in epilepsy / P. Genton, F. Semah, E. Trinka // *Drug Safety*. – 2006. – V. 29. – №. 1. – P. 1–21.
35. Pardridge, W. The blood– brain barrier: bottleneck in brain drug development / W. M. Pardridge // *NeuroRx*. – 2005. – V. 2. – №. 1. – P. 3– 14.
36. Ballabh, P. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications / P. Ballabh, A. Braun, M. Nedergaard // *Neurobiology of disease*. – 2004. – V. 16. – №. 1. – P. 1–13.

37. Cardoso, F. Looking at the blood–brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches //Brain research reviews. – 2010. – V. 64. – №. 2. – P. 328–363.
38. Pardridge, W. Blood–brain barrier delivery / W. M. Pardridge // Drug discovery today. – 2007. – V. 12. – №. 1–2. – P. 54–61.
39. Angelow, S. Claudins and paracellular transport: an update / S. Angelow, S. L. Alan // Current opinion in nephrology and hypertension. – 2007. – V. 16. – №. 5. – P. 459–464.
40. Schlosshauer, B. Comparative anatomy, physiology and in vitro models of the blood–brain and blood–retina barrier / B. Schlosshauer, H. Steuer // Current Medicinal Chemistry–Central Nervous System Agents. – 2002. – V. 2. – №. 3. – P. 175–186.
41. Aird, W. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds / W. C. Aird // Circulation research. – 2007. – V. 100. – №. 2. – P. 174–190.
42. Daneman, R. The blood–brain barrier / R. Daneman, A. Prat // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2015. – V. 7. – №. 1. – P. 412.
43. Armulik, A. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises / A. Armulik, G. Genové, C. Betsholtz // Developmental cell. – 2011. – V. 21. – №. 2. –P. 193–215.
44. Fisher, M. Pericyte signaling in the neurovascular unit //Stroke. – 2009. – V. 40. – №. 3. – P. 13–15.
45. Wong, A. The blood–brain barrier: an engineering perspective / A. Wong, M. Ye, A. Levy, J. Rothstein, D. Bergles, P. C. Searson // Frontiers in neuroengineering. – 2013. – V. 6. – P. 7.
46. Carvey, P. The blood–brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective / P. M. Carvey, B. Hendey, A. J. Monahan // Journal of neurochemistry. – 2009. – V. 111. – №. 2. – P. 291–314.

47. Alvarez, J. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis / J. I. Alvarez, R. Cayrol, A. Prat // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–Molecular Basis of Disease*. – 2011. – V. 1812. – №. 2. – P. 252–264.
48. Tontsch, U. Glial cells and neurons induce blood–brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells / U. Tontsch, H. C. Bauer // *Brain research*. – 1991. – V. 539. – №. 2. – P. 247–253.
49. Qosa, H. Regulation of ABC efflux transporters at blood–brain barrier in health and neurological disorders / H. Qosa, D. S. Miller, P. Pasinelli, D. Trotti, // *Brain research*. – 2015. – V. 1628. – P. 298 – 316.
50. Sharom, F. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2008 – P.105–127.
51. Decleves, X. Molecular and functional MDR1-Pgp and MRPs expression in human glioblastoma multiforme cell lines / X. Decleves, A. Fajac, J. Lehmann-Che, M. Tardy, C. Mercier, I. Hurbain, J. M. Scherrmann, // *International journal of cancer*. – 2002. – V. 98. – №. 2. – P. 173–180
52. Miller, D. ABC transporter regulation by signaling at the blood–brain barrier: relevance to pharmacology // *Advances in pharmacology*. – 2014. – V. 71. – P. 1 – 24.
53. Koziara, J. In situ blood–brain barrier transport of nanoparticles / J. M. Koziara, P. R. Lockman, D. D. Allen, R. J. Mumper, // *Pharmaceutical research*. – 2003. – V. 20. – №. 11. – P. 1772– 1778.
54. Pardridge, W. The blood– brain barrier: bottleneck in brain drug development / W. M. Pardridge // *NeuroRx*. – 2005. – V. 2. – №. 1. – P. 3 – 14.
55. Abbott, N. Structure and function of the blood–brain barrier / N. J. Abbott, A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R Yusof, D. J. Begley // *Neurobiology of disease*. – 2010. – V. 37. – №. 1. – P. 13– 25.
56. De Boer, A. The role of drug transporters at the blood– brain barrier / A. G. De Boer, I. C. J. Van Der Sandt, P. J. Gaillard // *Annual review of pharmacology and toxicology*. – 2003. – V. 43. – №. 1. – P. 629 – 656.

57. Schaddelee, M. Blood–brain barrier transport of synthetic adenosine A1 receptor agonists in vitro: structure transport relationships / M. P. Schaddelee, H. L. Voorwinden, D. Groenendaal, A. Hersey, A. P. Ijzerman, M. Danhof, A. G. De Boer // *European journal of pharmaceutical sciences*. – 2003. – V. 20. – №. 3. – P. 347– 356.
58. Dadparvar, M. H6 human serum albumin nanoparticles—development and transport over an in vitro blood– brain barrier model / M. Dadparvar, S. Wagner, S. Wien, J. Kufleitner, F. Worek, H. Von Briesen, J. Kreuter // *Toxicology letters*. – 2011. – V. 206. – №. 1. – P. 60– 66.
59. Van Tellingen, O. Overcoming the blood– brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment / O. Van Tellingen, B. Yetkin– Arik, M. C. de Gooijer, P. Wesseling, T. Wurdinger, H. E. de Vries // *Drug Resistance Updates*. – 2015. – V. 19. – P. 1– 12.
60. An Bree, J. Drug transport across the blood—brain barrier / J. B. Van Bree, M. M. De Boer, A. G. Danhof, D. D. Breimer // *Pharmaceutisch Weekblad*. – 1992. – V. 14. – №. 6. – P. 338 – 348.
61. Tamai, I. Drug delivery through the blood– brain barrier / I. Tamai, A. Tsuji // *Advanced drug delivery reviews*. – 1996. – V. 19. – №. 3. – P. 401– 424.
62. Upadhyay, R. Drug delivery systems, CNS protection, and the blood brain barrier // *BioMed research international*. – 2014. – P. 201.
63. Hersh, D. Evolving drug delivery strategies to overcome the blood brain barrier / D. S. Hersh, A. Wadajkar, B N. Roberts, G J. Perez, P N. Connolly, V. Frenkel, J. A. Kim // *Current pharmaceutical design*. – 2016. – V. 22. – №. 9. – P. 1177– 1193.

Федеральное государственное автономное
Образовательное учреждение
Высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

« 13 » 06 20 18 г.

МАГИСТРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Уменьшение токсичности вальпроевой кислоты
за счет ее адресной доставки в головной мозг ДНК – аптамерами

06.04.01. «Биология»
06.04.03.01 «Биофизика»

Научный руководитель профессор, д.б.н.

Т.Н. Замай

Выпускник ББ16–03М 041625613

 В.О. Ющенко

Рецензент профессор, д.б.н.

 А.А. Савченко

Красноярск 2018